

基于 HPLC-DAD-ELSD 及响应面设计优化黄芪浸润工艺研究

杨志城^{1,2,3}, 张福明^{2,3}, 孙彩虹^{1,2,3}, 张可佳^{2,3}, 陈 玉^{2,3}, 张迎宾^{2,3}, 鄂秀辉^{2,3*}

1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198

2. 天士力控股集团有限公司 天士力研究院现代中药开发中心, 天津 300410

3. 天士力医药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410

摘要: 目的 采用 HPLC-DAD-ELSD 及 Box-Behnken 响应面法优选黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 药材浸润工艺。方法 基于 HPLC-DAD-ELSD 及响应面设计方法, 以饮片合格率、指标成分含量、弯折检查为综合考察指标, 选取浸润温度、浸润时间、加水量 3 个因素进行响应面实验设计, 优化黄芪药材浸润工艺参数。结果 最优浸润工艺为浸润温度 20 ℃、浸润时间 6 h, 加水量为 1:0.988, 黄芪饮片合格率为 95.81%, 毛蕊异黄酮苷为 0.072%, 黄芪甲苷为 0.276%。结合指纹图谱及热图分析, 黄芪药材在浸润过程中发生物质基础变化, 浸润过程中应当严格控制浸润参数, 保证饮片的质量均一。结论 优选后的黄芪药材浸润工艺稳定可行, 重复性好, 可以为黄芪药材饮片大批量生产工艺开发提供参考。

关键词: 黄芪; 浸润; 指标成分; 工艺优化; 物质变化; 毛蕊异黄酮苷; 黄芪甲苷; 指纹图谱; 热图分析; HPLC-DAD-ELSD
中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)24-6196-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.008

Optimization of infiltration process of *Astragali Radix* based on HPLC-DAD-ELSD and response surface design

YANG Zhi-cheng^{1,2,3}, ZHANG Fu-ming^{2,3}, SUN Cai-hong^{1,2,3}, ZHANG Ke-jia^{2,3}, CHEN Yu^{2,3}, ZHANG Ying-bin^{2,3}, E Xiu-hui^{2,3}

1. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. Development Center of Modern Chinese Medicine, Research Institute of Tasly Holding Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To optimize the infiltration process of *Astragalus* (*Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*) medicinal materials by Box-Behnken response surface method. **Methods** Based on the HPLC-DAD-ELSD and response surface design method, the qualified rate of decoction pieces, the content of index components and bending inspection were used as comprehensive inspection indicators, and the three factors of infiltration were selected for response surface experimental design to optimize the infiltration process of *Astragalus* medicinal materials parameter. **Results** The best infiltration process was as following: infiltration temperature was 20 ℃, with water addition of 1:0.988 for 6 h. Under this process, the qualified rate of *Astragalus* pieces was 95.81%, the content of calycosin-7-glucoside was 0.072%, and the content of astragaloside IV was 0.276 %. Combining fingerprint analysis and heat map analysis, the material basis of *A. membranaceus* var. *mongholicus* changed during the infiltration process. The infiltration parameters should be strictly controlled during the infiltration process to ensure uniform quality of the pieces. **Conclusion** The optimized *Astragalus* medicinal material infiltration process is stable and feasible with good reproducibility, which can provide a reference for the mass production process development of *Astragalus* medicinal slices.

Key words: *Astragali Radix*; infiltration; index composition; process optimization; material change; calycosin-7-glucoside; astragaloside IV; fingerprint analysis; heat map analysis; HPLC-DAD-ELSD

收稿日期: 2020-07-21

基金项目: 国家科技重大专项课题 (2017ZX09301005)

作者简介: 杨志城, 男, 硕士研究生, 研究方向为工业药学。E-mail: m15657995175@163.com

*通信作者 鄂秀辉, 男, 主要从事中药新药开发与质量控制研究。E-mail: exh@tasly.com

黄芪, 又名黄耆, 为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。具有补气固表、利水消肿、托毒排脓、生肌等功效^[1-2]。临床上黄芪药材需经前处理制成合格饮片方可入药。

中药材前处理是根据原药材或饮片的具体性质, 在选用优质药材基础上将其经适当的清洗、浸润、切制、干燥等手段, 加工成具有一定质量规格的中药材中间品或半成品。润制作为切制工艺的前提, 起着至关重要的作用。润制后药材便于切制, 成型稳定。《中国药典》2020 年版中规定: “黄芪, 除去杂质, 大小分开, 洗净, 润透, 切厚片, 干燥”^[1], 但对于润透的标准却未给出明确规定, 导致工艺多样。浸润不足则“硬心”“炸心”等, 过度则导致“伤水”^[3]。药材的浸润会造成成分的变化, 直接影响饮片的质量。因此, 研究切制工艺对成分变化的影响显得尤为重要。药材的浸润与时间、温度以及加水量等多因素密切相关。据此, 不少学者提出了“少泡多浸、药透水尽”的观点^[4-6], 其初衷均为减少药材成分的丢失。笔者在此基础上, 根据黄芪药材的浸润动力学研究结果, 设计黄芪药材浸润的响应面实验, 并测定不同浸润条件下黄芪指标性成分的含量; 结合饮片合格率等相关因素优选了黄芪药材浸润工艺; 结合指纹图谱及热图分析结果, 佐证黄芪在浸润中发生物质改变; 为黄芪浸润工艺开发以及质量保证提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪、Agilent G4260 蒸发光散射检测器、安捷伦 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱, 美国 Agilent 公司; GCK3308 全自动空气源, 北京中惠普分析技术研究所; 药典四号筛, 浙江上虞市纱网厂; Models-30-1060 鼓风干燥箱, 美墨尔特有限公司; DK-98-2 水浴锅、DX-60 小型药材粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; CX-60 药材断片机, 邢台亿资莱机械制造有限公司; XS 205D 电子分析天平, 瑞士梅特勒托利多公司; GCK3308 全自动空气源, 北京中惠普分析技术研究所。

1.2 试药

蒙古黄芪 (批号 Y18012201, 产地甘肃), 由甘肃中天药业责任有限公司提供, 经天士力鄂秀辉高级工程师鉴定为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *A.*

membranaceus (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 干燥根。甲醇为分析纯, 购于天津市康科德化学试剂有限公司; 乙腈为色谱纯, 购于美国默克公司; 水为超纯水。对照品毛蕊异黄酮 (批号 HY10822, 质量分数 ≥ 95%)、芒柄花苷 (批号 DZP10441, 质量分数 ≥ 98%)、黄芪皂苷 II (批号 ZP10274, 质量分数 ≥ 98%)、异黄芪皂苷 II (批号 ZP10322, 质量分数 ≥ 95%) 购自天津万象恒远科技有限公司; 对照品黄芪甲苷 (批号 110781-201717, 质量分数 ≥ 97.4%)、毛蕊异黄酮苷 (批号 111920-201505, 质量分数 ≥ 97.6%)、芒柄花素 (批号 111703-201504, 质量分数 ≥ 95%) 购自中国药品食品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 黄芪药材浸润动力学研究

黄芪药材抢水洗去表面泥沙, 自然晾干。随机选取个头大小一致黄芪药材并分组, 记录每组药材初始质量。将药材浸没于规定温度水中, 每隔一段时间后取出, 擦去表面的残留水分, 记录质量。每组实验重复 3 次, 取平均值。以时间为横坐标, 吸水率为纵坐标, 绘制黄芪药材在 20 °C (室温) 以及较高温度 60 °C 下^[6-7]浸润时吸水率随时间变化规律。结果见图 1。

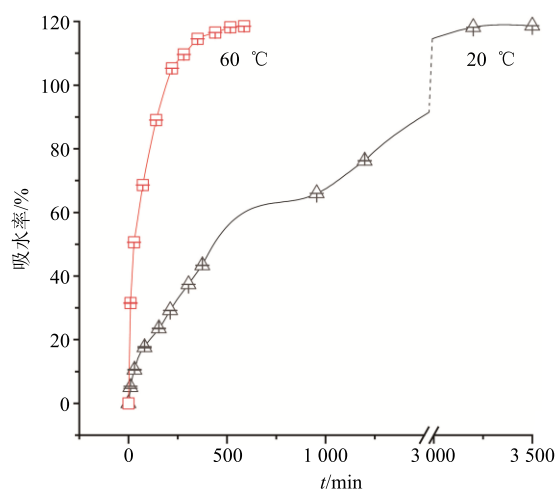


图 1 吸水率随时间变化图

Fig. 1 Changes of water absorption rate with time

根据吸水率-时间变化图 (图 1) 可知, 黄芪药材在前期吸水速度较快。60 °C 下 5 h 之前速度最快, 20 °C 下前 6 h 吸水速度较快, 随着时间推移, 吸水速度下降。而在 20 °C 下, 达到最大吸水量需要接近 60 h (故图中未绘制完整)。提高温度, 可以显著地加快药材的吸水速度, 但药材成分损失是否与温

度相关需进一步实验验证。药材在浸润过程中, 常温(20℃)及60℃下最大吸水量率一致, 为药材水(1:1.2)。

2.2 黄芪药材浸润工艺优化

2.2.1 毛蕊异黄酮苷测定^[1]

(1) 对照品溶液的制备: 取毛蕊异黄酮苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含毛蕊异黄酮苷 50 μg/mL 的溶液, 即得毛蕊异黄酮苷对照品溶液。

(2) 供试品溶液制备: 取各批次黄芪药材粉末 1 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 水浴加热回流 4 h, 放冷, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

(3) 色谱条件: 色谱柱为安捷伦 Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~20 min, 80%~60%乙腈; 20~30 min, 60%乙腈; 检测波长为 260 nm, 柱温 25℃; 进样量 10 μL; 理论板数按毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰计算不低于 3 000。

(4) 样品测定: 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定。

2.2.2 黄芪甲苷测定^[1]

(1) 对照品溶液的制备: 取黄芪甲苷对照品适量, 精密称定, 加 80%甲醇制成含黄芪甲苷 0.5 mg/mL 的溶液, 即得黄芪甲苷对照品溶液。

(2) 供试品溶液制备: 取各批次黄芪药材粉末 4 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50 mL 含 4%浓氨的 80%甲醇溶液, 密塞, 加热回流 1 h, 放冷, 用上述溶剂补足减失质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中, 蒸干, 残渣加 80%甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

(3) 色谱条件: 色谱柱为安捷伦 Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-水(32:68)为流动相; 蒸发光散射检测器检测; 柱温 25℃; 进样量 20 μL; 理论塔板数按黄芪甲苷峰计算不低于 4 000。

(4) 样品测定: 分别精密吸取对照品溶液 5、10 μL, 供试品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 用外标两点法对方程计算。

2.2.3 饮片合格率检查^[3] 取出浸润后药材, 除去

表面尚存水分, 快速切制, 摊平, 60℃烘干。分别记录合格片、坏片(连刀片、裂片等)质量, 以合格片/(合格片+坏片)作为饮片合格率。

2.2.4 弯折检查^[3] 药材浸润后握于手中, 大拇指向外推, 其余四指向内缩, 以药材略弯曲, 不易折断为合格, 记为“1”; 否则为“0”。

2.2.5 黄芪药材浸润工艺研究方法 根据过水浸润的结果, 设计切制研究的响应面实验, 探究不同浸润条件下黄芪化学成分的变化, 结合饮片合格率, 为优选黄芪的浸润工艺提供参考。

黄芪抢水洗去表面泥沙, 自然晾干。随机选取个头大小一致的黄芪 17 份, 每份 200 g。置于聚乙烯包装袋中, 加入设计量的水, 封闭。将包装袋置于设定温度的恒温箱中至固定时间。每隔 30 min 翻动药材包装袋, 使其均匀浸润。浸润结束, 取出, 稍晾, 切制, 烘干。取各样本打粉, 过四号筛, 备用。

2.2.6 浸润工艺设计及结果 结合文献及前期实验结果, 选择浸润时间(X_1)、浸润温度(X_2)、加水量(X_3)为考察因素, 以毛蕊异黄酮苷含量(Y_1)、黄芪甲苷含量(Y_2)、饮片合格率(Y_3)、弯折检查(Y_4)^[3]为考察指标, 采用 Design-Expert 12.0 设计的 3 因素 3 水平响应面试验, 测定黄芪在不同浸润条件下指标性成分含量变化, 具体实验方案及结果见表 1。

采用 Design-Expert 12.0 分别对毛蕊异黄酮苷含量、黄芪甲苷含量、饮片合格率、弯折检查进行方差分析, 结果显示毛蕊异黄酮苷含量、饮片合格率、弯折检查模型均具有显著性, 而黄芪甲苷模型无显著性, 方差分析结果见表 2、3。各指标随因素变化响应面图见图 2。

毛蕊异黄酮苷含量方差分析结果显示, 回归整体模型达到显著性水平($P<0.05$), 失拟项不显著, 说明 2 次模型成立。由 F 值可以判断, 在整体因素中, 对毛蕊异黄酮苷含量影响大小由高到低为 $X_2>X_1>X_3$ 。2 次回归模型方程为 $Y_1=0.033\ 9-0.004\ 45\ X_1-0.015\ 1\ X_2+0.000\ 85\ X_3+0.000\ 675\ X_1X_2-0.002\ 7\ X_1X_3-0.002\ 8\ X_2X_3+0.002\ 9\ X_1^2+0.011\ 7\ X_2^2-0.000\ 9\ X_3^2$, 回归模型的 $R^2=0.943\ 5$, 说明通过 2 次回归得到的毛蕊异黄酮苷模型拟合程度好。数据分析结果显示, 毛蕊异黄酮苷的保留率随着温度的升高而逐渐下降, 推测温度可能促进其溶解或者分解, 从而造成损失。

表 1 响应面设计及结果

Table 1 Response surface design and results

试验号	X_1/h	$X_2/^\circ C$	$X_3/\text{倍}$	$Y_1/\%$	&	$Y_2/\%$	&	$Y_3/\%$	Y_4	试验号	X_1/h	$X_2/^\circ C$	$X_3/\text{倍}$	$Y_1/\%$	&	$Y_2/\%$	&	$Y_3/\%$	Y_4
1	9 (0)	20 (-1)	1.2 (+1)	0.059 7	↓	0.284 5	↑	76.43	1	10	6	40	0.4	0.035 1	↓	0.282 4	↑	88.15	1
2	9	20	0.4 (-1)	0.055 2	↓	0.285 6	↑	92.77	0	11	12	40	1.2	0.031 4	↓	0.296 4	↑	51.79	1
3	6 (-1)	40 (0)	1.2	0.045 0	↓	0.290 4	↑	74.60	1	12	9	40	0.8	0.030 4	↓	0.281 0	↑	72.41	1
4	12 (+1)	20	0.8 (0)	0.060 7	↓	0.274 2	↑	72.45	1	13	6	60	0.8	0.035 0	↓	0.281 1	↑	58.37	1
5	6	20	0.8	0.071 6	↓	0.256 4	↓	96.21	0	14	12	40	0.4	0.032 2	↓	0.250 1	↓	83.19	1
6	9	60 (+1)	0.4	0.035 5	↓	0.293 6	↑	87.08	1	15	9	40	0.8	0.042 2	↓	0.271 8	↑	78.95	1
7	9	40	0.8	0.031 4	↓	0.230 0	↓	70.06	1	16	9	40	0.8	0.034 3	↓	0.295 7	↑	73.14	1
8	9	60	1.2	0.028 7	↓	0.265 2	↓	48.74	1	17	9	40	0.8	0.031 1	↓	0.248 5	↓	68.12	1
9	12	60	0.8	0.026 8	↓	0.303 5	↑	64.50	1										

“&” 原药材中毛蕊异黄酮苷含量为 0.078 5%，黄芪甲苷含量为 0.270 7%；“↓ ↑” 表示相较于未浸润药材含量上升、下降；弯折检查：设定折弯检查合格为“1”，不合格为“0”

“&” The content of calycosin-7-glucoside in the original medicinal materials is 0.078 5%, and the content of astragaloside IV is 0.270 7%. “↓ ↑” Indicates that the content of medicinal materials has increased or decreased compared with that of uninfiltrated materials. Bending inspection: set the qualified bend inspection to “1” and the unqualified to “0”

表 2 Y_1 和 Y_2 方差分析Table 2 Variance analysis of Y_1 and Y_2

方差来源	Y_1						Y_2					
	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.002 7	9	0.000 3	12.990 0	0.001 4	*	0.001 7	9	0.000 2	0.280 0	0.960 0	无
X_1	0.000 2	1	0.000 2	6.870 0	0.034 4	*	0.000 0	1	0.000 0	0.035 9	0.855 0	
X_2	0.001 8	1	0.001 8	79.6000	<0.000 1	**	0.000 2	1	0.000 2	0.339 1	0.578 6	
X_3	5.780×10^{-6}	1	5.780×10^{-6}	0.250 6	0.632 0		0.000 1	1	0.000 1	0.114 4	0.745 1	
X_1X_2	1.823×10^{-6}	1	1.823×10^{-6}	0.079 0	0.786 8		5.290×10^{-6}	1	5.290×10^{-6}	0.007 9	0.931 8	
X_1X_3	0.000 0	1	0.000 0	1.240 0	0.302 1		0.000 4	1	0.000 4	0.545 6	0.484 1	
X_2X_3	0.000 0	1	0.000 0	1.380 0	0.277 9		0.000 2	1	0.000 2	0.277 2	0.614 8	
X_1^2	0.000 0	1	0.000 0	1.530 0	0.255 7		0.000 1	1	0.000 1	0.189 5	0.676 4	
X_2^2	0.000 6	1	0.000 6	25.190 0	0.001 5	*	0.000 3	1	0.000 3	0.391 0	0.551 6	
X_3^2	3.060×10^{-6}	1	3.060×10^{-6}	0.132 6	0.726 5		0.000 3	1	0.000 3	0.499 0	0.502 8	
残差	0.000 2	7	0.000 0				0.004 7	7	0.000 7			
失拟项	0.000 1	3	0.000 0	0.923 9	0.506 1	无	0.002 0	3	0.000 7	0.955 1	0.494 7	无
自然误差	0.000 1	4	0.000 0				0.002 7	4	0.000 7			
总离差	0.002 9	16					0.006 4	16				

*具有显著性，**具有极强显著性，表 3 同

*significant **highly significant, same as table 3

对黄芪甲苷含量变化分析，结果显示，最大值与最小值之间的差距仅为 0.073 5%，不同浸润条件下含量的 RSD 为 7.053 6%。该结果提示，在本实验所选择的考察因素范围内，黄芪甲苷含量变化程度较低，各因素对黄芪甲苷含量均无显著性影响。

饮片合格率方差分析结果显示，回归整体模型达到极显著性水平 ($P < 0.000 1$)，失拟项不显著，

说明 2 次模型成立。由 F 值可以判断在整体因素中，对饮片合格率影响大小由高到低为 $X_3 > X_2 > X_1$ 。2 次回归模型方程为 $Y_3 = 73.938 8 - 5.675 0 X_1 - 9.896 2 X_2 - 12.453 7 X_3 + 7.472 5 X_1X_2 - 4.462 5 X_1X_3 - 5.500 0 X_2X_3$ ，回归模型 $R^2 = 0.948 2$ ，说明通过 2 次回归得到的饮片合格率模型拟合程度好。数据分析结果显示，饮片合格率随浸润时间、浸润温度、加

表 3 Y_3 和 Y_4 方差分析
Table 3 Variance analysis of Y_3 and Y_4

方差来源	Y_3						Y_4					
	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2 705.91	6	450.98	30.510 0	<0.000 1	**	1.51	9	0.168 3	4.710 0	0.026 6	*
X_1	257.64	1	257.64	17.430 0	0.001 9	*	0.125 0	1	0.125 0	3.500 0	0.103 6	
X_2	783.49	1	783.49	53.000 0	<0.000 1	**	0.500 0	1	0.500 0	14.000 0	0.007 2	*
X_3	1 240.77	1	1 240.77	83.930 0	<0.000 1	**	0.125 0	1	0.125 0	3.500 0	0.103 6	
X_1X_2	223.35	1	223.35	15.110 0	0.003 0	*	0.250 0	1	0.250 0	7.000 0	0.033 1	*
X_1X_3	79.66	1	79.66	5.390 0	0.042 7	*	0.000 0	1	0.000 0	0.000 0	1.000 0	
X_2X_3	121.00	1	121.00	8.190 0	0.016 9	*	0.250 0	1	0.250 0	7.000 0	0.033 1	*
X_1^2							0.000 0	1	0.000 0	0.000 0	1.000 0	
X_2^2							0.263 2	1	0.263 2	7.370 0	0.030 0	*
X_3^2							0.000 0	1	0.000 0	0.000 0	1.000 0	
残差	147.83	10	14.78				0.250 0	7	0.035 7			
失拟项	80.67	6	13.45	0.800 9	0.616 0	无	0.250 0	3	0.083 3			
自然误差	67.15	4	16.79				0.000 0	4	0.000 0			
总离差	2 853.73	16					1.76	16				

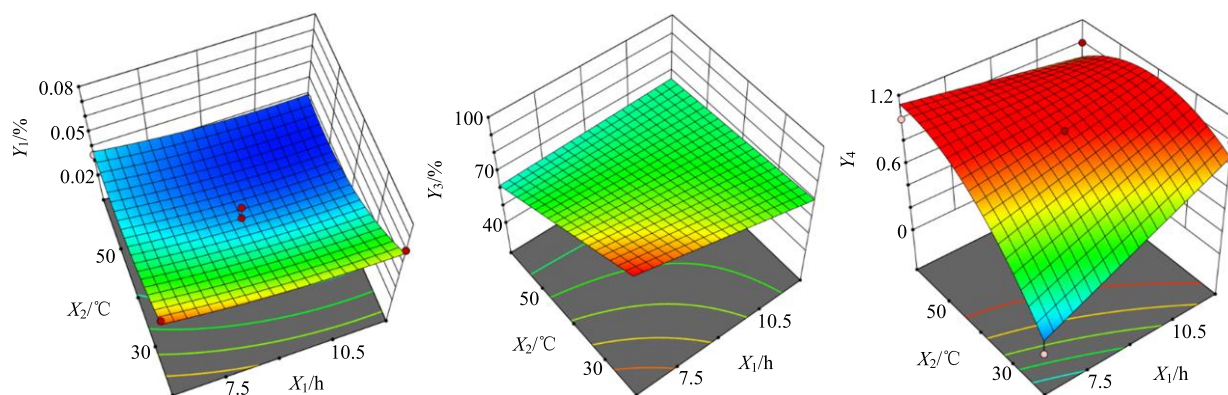


图 2 因素交互对 Y_1 、 Y_3 、 Y_4 的影响

Fig. 2 Influence of factor interaction on Y_1 , Y_3 and Y_4

水量的增加而减少。但实际中, 饮片的润制需要达到“浸润透心”, 故采用弯折法^[2]判断药材是否达到该要求。弯折实验时, 能顺利弯折, 且断面为润透痕迹记为 1; 不能顺利弯折, 断面有白心记为 0。

弯折检查方差分析结果显示, 回归模型整体达到显著水平 ($P < 0.05$), 由 F 值可以判断在整体因素中, 对弯折检查影响大小由高到低为 $X_2 > X_1 = X_3$, 2 次回归模型方程为 $Y_4 = 0.882 4 + 0.125 0 X_1 + 0.250 0 X_2 + 0.125 0 X_3 - 0.250 0 X_1X_2 - 0.250 0 X_1X_3$, 回归模型 $R^2 = 0.858 3$, 说明通过 2 次回归得到的弯折检查模型拟合程度好。数据分析结果显示, 弯折检查结果随浸润时间、浸润温度、加水量增加而增加。

采用 Design-Expert 12.0 软件优化工艺参数, 参数限制设置如表 4。工艺优化结果见表 5。得到的最优工艺为浸润时间 6 h, 浸润温度为 20 °C, 加水量为 0.988。该条件下, 饮片合格率为 95.810%, 毛蕊异黄酮苷质量分数为 0.072%, 黄芪甲苷质量分数为 0.276%, 弯折检查合格。结合设计空间理念, 选取满意度 > 0.990 的工艺参数, 浸润时间 6 h, 浸润温度 20 °C, 加水量为 0.917~1.012 倍, 该范围内, 饮片合格率为 95.458%~96.210%, 毛蕊异黄酮苷质量分数为 0.071%~0.072%, 黄芪甲苷质量分数为 0.276%, 弯折检查合格。

2.2.7 验证试验 为验证工艺稳定性, 称取抢水洗、分拣后的药材 1、2、3 kg, 按照最优工艺每组平行

表 4 参数优化限制 (编码后)

Table 4 Parameter optimization limit table (coded)

名称	目标	最低限	最高限	重要性
X_1	界内	-1	1	3
X_2	界内	-1	1	3
X_3	界内	-1	1	3
Y_1	最大化	0.026 8	0.071 6	3
Y_2	最大化	0.23	0.303 5	3
Y_3	最大化	48.74	96.21	5
Y_4	界内	0	1	1

试验 3 次, 结果见表 6。重复验证试验结果显示, 该工艺稳定、可重复, 与理论值差异小。

2.3 不同浸润条件下药材指纹图谱及相似度计算

2.3.1 混合对照品溶液的制备 取黄芪甲苷、异黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 II、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素、芒柄花苷适量, 加甲醇制成混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 同“2.2.1”项。

2.3.3 色谱条件 色谱柱为安捷伦 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为水-乙腈,

表 5 工艺优化结果 (编码后)

Table 5 Process optimization results (coded)

编号	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	满意度	备注
1	-1.000	-1.000	0.471	0.072	0.276	95.810	0.301	0.995	选择
2	-1.000	-1.000	0.454	0.072	0.276	95.850	0.295	0.994	
3	-1.000	-1.000	0.440	0.071	0.276	95.883	0.290	0.994	
4	-1.000	-0.999	0.481	0.072	0.276	95.757	0.306	0.994	
5	-1.000	-1.000	0.372	0.071	0.276	96.056	0.264	0.993	
6	-1.000	-1.000	0.328	0.071	0.276	96.166	0.248	0.993	
7	-1.000	-0.996	0.503	0.072	0.276	95.639	0.318	0.992	
8	-1.000	-1.000	0.311	0.071	0.276	96.208	0.242	0.992	
9	-1.000	-0.999	0.348	0.071	0.276	96.093	0.257	0.992	
10	-1.000	-0.994	0.511	0.072	0.276	95.597	0.322	0.992	
11	-0.989	-1.000	0.496	0.072	0.276	95.571	0.315	0.992	
12	-0.997	-1.000	0.293	0.071	0.276	96.210	0.236	0.991	

表 6 验证试验

Table 6 Verification test

药材质量/kg	Y_1 /%	RSD/%	Y_2 /%	RSD/%	Y_3 /%	RSD/%	Y_4
1	0.071	2.158	0.274	1.472	95.990	1.218	1
2	0.071	2.143	0.275	1.307	95.730	0.407	1
3	0.070	2.471	0.274	1.283	95.840	0.402	1

洗脱梯度: 0~18 min, 10%~20%乙腈; 18~30 min, 20%~28%乙腈; 30~40 min, 28%~35%乙腈; 40~60 min, 35%~50%乙腈; 60~70 min, 50%~80%乙腈; 70~80 min, 80%~90%乙腈; 80~90 min, 90%乙腈; 检测方法为 ELSD; 进样量 20 μL。

2.3.4 测定方法 分别精密吸取混合对照品溶液及供试品溶液各 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录指纹图谱信息。

2.3.5 指纹图谱方法学考察

(1) 精密度: 取原药材粉末, 照“2.2.1”项下样品制备方法制备样品, 连续进样 6 针, 测得各共

有峰 RSD 均小于 5%, 结果表明仪器精密度良好。

(2) 重复性: 取原药材粉末, 照“2.2.1”项下样品制备方法, 平行制备 6 份样品, 测得各共有峰 RSD 均小于 5%, 结果表明重复性良好。

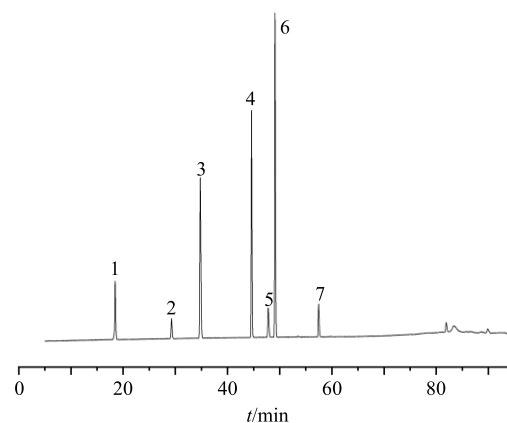
(3) 稳定性: 取原药材粉末, 照“2.2.1”项下样品制备方法制备样品, 分别在 0、4、8、12、18、24、36、48 h 进样, 测得各共有峰 RSD 均小于 5%, 结果表明稳定性良好。

2.3.6 指纹图谱的建立及分析 根据前期指纹图谱实验结果, 记录 ELSD 检测器下的指纹图谱及混合对照品信息, 将响应面实验中 17 份样品色谱图信息

(S1~S17) 以及原药材色谱图信息 (S18) 导入到中药指纹图谱相似度软件中, 计算相似度, 并根据共有峰信息绘制热图, 直观体现不同浸润条件下药材的成分变化。

由图 3、4 以及表 7 可以明显看出, 不同浸润工艺下, 药材的整体成分改变, 然指标性成分检测结果符合药典标准, 相对原药材均减少。由聚类结果 (图 5) 可以看出, 黄芪浸润过程中共有峰主要可聚为 3 大类, 峰 1~4、7、13 聚为一类, 峰 5、8、12、10 聚为一类, 峰 6、11、9 聚为一类。指纹图谱结合热图各成分颜色变化可以清晰看出共有峰中发生变化的成分及其变化程度。由图 5 可以看出峰 1 (毛蕊异黄酮苷)、2 (芒柄花苷)、3 (毛蕊异黄酮)、5 (黄芪皂苷 II)、7、8、12、13 含量变化程度较大。在 ELSD 检测器下, 黄芪原药材与浸润后药材相似度最低为 0.813 (S16), 不同浸润样本 S14 与 S6 之间相似度最低为 0.843。其中毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷与毛蕊异黄酮、芒柄花素变化方向相反, 推测可能是苷水解转化为苷元。相似度及热图结果表明,

药材浸润过程中部分成分含量发生改变, 进而影响其药效。故在药材浸润过程中, 需切实有效的控制药材浸润工艺参数, 保证饮片的质量均一稳定。



1-毛蕊异黄酮苷 2-芒柄花苷 3-毛蕊异黄酮 4-黄芪甲苷
5-黄芪皂苷 II 6-芒柄花素 7-黄芪皂苷 I
1-calycosin-7-glucoside 2-ononin 3-calycosin 4-astragaloside IV
5-astragaloside II 6-formononetin 7-astragaloside I

图 3 混合对照品图

Fig. 3 Picture of mixed reference substance

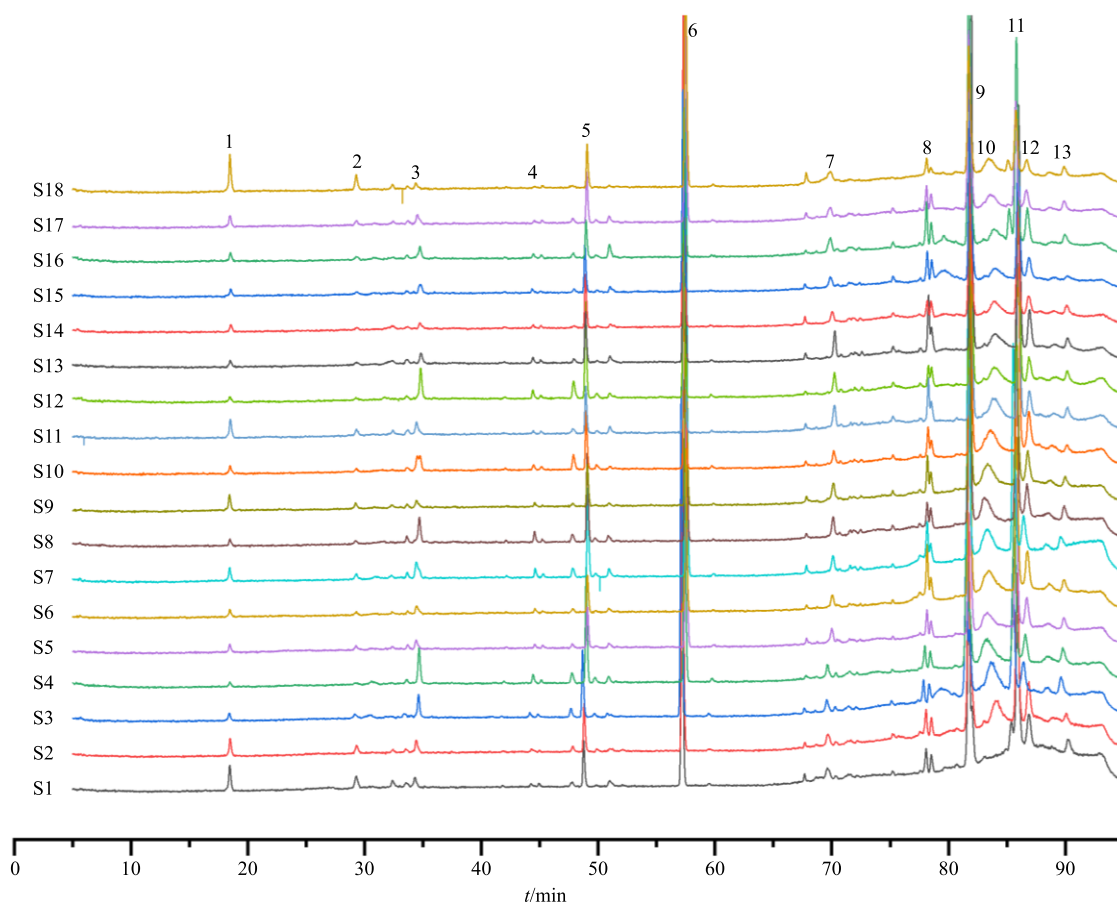


图 4 ELSD 指纹图谱对比 (S18: 原药材)

Fig. 4 Comparison of ELSD fingerprints (S18: original medicinal materials)

表 7 不同浸润条件下指纹图谱相似度 (ELSD)
Table 7 Fingerprint similarity (ELSD) under different infiltration conditions

样品	相似度																	
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
S1	1.000	0.991	0.960	0.956	0.983	0.922	0.976	0.980	0.958	0.979	0.963	0.956	0.963	0.967	0.989	0.925	0.984	0.945
S2	0.991	1.000	0.987	0.974	0.987	0.922	0.991	0.988	0.962	0.988	0.956	0.951	0.948	0.981	0.986	0.908	0.991	0.963
S3	0.960	0.987	1.000	0.977	0.970	0.900	0.989	0.977	0.944	0.973	0.928	0.925	0.914	0.982	0.962	0.868	0.984	0.974
S4	0.956	0.974	0.977	1.000	0.974	0.922	0.970	0.992	0.952	0.988	0.946	0.969	0.923	0.947	0.975	0.902	0.971	0.921
S5	0.983	0.987	0.970	0.974	1.000	0.969	0.964	0.989	0.991	0.994	0.989	0.982	0.981	0.945	0.997	0.960	0.992	0.931
S6	0.922	0.922	0.900	0.922	0.969	1.000	0.874	0.933	0.992	0.953	0.989	0.970	0.981	0.844	0.961	0.990	0.947	0.843
S7	0.976	0.991	0.989	0.970	0.964	0.874	1.000	0.980	0.925	0.971	0.919	0.921	0.909	0.996	0.966	0.856	0.979	0.975
S8	0.980	0.988	0.977	0.992	0.989	0.933	0.980	1.000	0.965	0.997	0.966	0.978	0.949	0.960	0.992	0.925	0.983	0.932
S9	0.958	0.962	0.944	0.952	0.991	0.992	0.925	0.965	1.000	0.979	0.995	0.979	0.988	0.902	0.984	0.980	0.978	0.900
S10	0.979	0.988	0.973	0.988	0.994	0.953	0.971	0.997	0.979	1.000	0.977	0.982	0.960	0.948	0.994	0.942	0.984	0.924
S11	0.963	0.956	0.928	0.946	0.989	0.989	0.919	0.966	0.995	0.977	1.000	0.987	0.994	0.894	0.988	0.989	0.973	0.884
S12	0.956	0.951	0.925	0.969	0.982	0.970	0.921	0.978	0.979	0.982	0.987	1.000	0.973	0.890	0.986	0.974	0.960	0.864
S13	0.963	0.948	0.914	0.923	0.981	0.981	0.909	0.949	0.988	0.960	0.994	0.973	1.000	0.890	0.980	0.988	0.969	0.881
S14	0.967	0.981	0.982	0.947	0.945	0.844	0.996	0.960	0.902	0.948	0.894	0.890	0.890	1.000	0.946	0.968	0.969	0.983
S15	0.989	0.986	0.962	0.975	0.997	0.961	0.966	0.992	0.984	0.994	0.988	0.986	0.980	0.946	1.000	0.959	0.989	0.926
S16	0.925	0.908	0.868	0.902	0.960	0.990	0.856	0.925	0.980	0.942	0.989	0.974	0.988	0.968	0.959	1.000	0.932	0.813
S17	0.984	0.991	0.984	0.971	0.992	0.947	0.979	0.983	0.978	0.984	0.973	0.960	0.969	0.969	0.989	0.932	1.000	0.965
S18 (原)	0.945	0.963	0.974	0.921	0.931	0.843	0.975	0.932	0.900	0.924	0.884	0.864	0.881	0.983	0.926	0.813	0.965	1.000

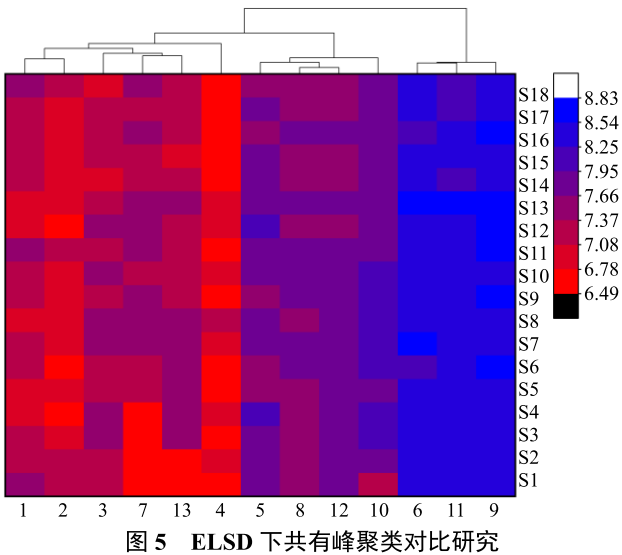


图 5 ELSD 下共有峰聚类对比研究
Fig. 5 Comparative study of clustering of common peaks under ELSD

4 讨论

药材市场上饮片的获得主要分为两种途径，产地鲜切后干燥保存、干燥后保存、临用切制。目前对于产地鲜切的研究较多^[8-10]，但对干燥药材浸润后的切制工艺研究报道较少，结合成分变化规律建

立工艺参数的文献更少。现代大规模生产中浸润程度的把握多凭借老药工的经验，具有极强的主观随意性。现代浸润工艺研究主要依靠机械成型控制，但从药材降低物质流失、提高药材质量上的研究较少^[11-13]，影响饮片质量均一可控。浸润工艺虽是中药炮制过程中一小部分，但是对中药饮片质量控制却有着不可忽视的作用^[14]。在质量控制过程中，以符合《中国药典》2020 年版规定即为合格产品，却忽略了中药具有“多成分、多靶点”的特性，在成分组成发生变化的情况下是否仍能保持其原有的药效活性，值得深入探究。

由于常温浸润时间较长，故研究者开发了低压冷浸工艺、高压冷浸工艺、热浸工艺等^[15-17]。考虑到黄芪常温常压条件下浸润时间较长，参考三七的热浸工艺，建立黄芪热浸法。然在热浸过程中，指标性成分毛蕊异黄酮苷随温度升高而降低，并且相关文献报道黄芪皂苷 I 在 60 ℃ 时含量下降快^[7]。热浸虽可加快吸水、减少浸润时间，但同时造成其他成分损失，故黄芪在浸润中应当避免加热。本研究中借助指纹图谱等手段，发现药材在浸润过程中伴

随着其他成分的改变,采用指纹图相似度软件分析发现不同浸润工艺下的饮片与同批次原药材指纹图谱相似度为 0.813~0.975,证明浸润工艺对饮片质量有影响,故有必要量化浸润工艺参数。本研究建立了一种中药黄芪饮片常压浸润工艺:浸润时间 6 h,浸润温度 20 ℃,加水量为 0.917~1.012,该范围内,饮片合格率、毛蕊异黄酮苷含量、黄芪甲苷含量均为较优值。重复验证后中证明该工艺饮片合格率高、指标性成分含量高,工艺稳定可行,可为工业化生产黄芪饮片的工艺建立提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
- [2] 王 敏. 黄芪注射液联合螺内酯治疗糖尿病肾病的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(4): 898-902.
- [3] 丁安伟. 中药炮制学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2005.
- [4] 车国跃, 马 兰. 浅谈“润药”对中药质量的影响 [J]. 黑龙江医药, 2003, 16(4): 305-306.
- [5] 杨冬生. 润法在中药炮制中的应用 [J]. 江西中医药, 1995, 26(S3): 95.
- [6] 张德政. 中药定量润药法在切制中的应用 [J]. 中成药研究, 1986, 8(2): 43.
- [7] 郑 娜, 师亚玲, 吉艳霞, 等. 温度和酸度对黄芪皂苷 IV、III、I 稳定性和转化的影响 [J]. 中南药学, 2014, 12(11): 1062-1065.
- [8] 张 军, 戴衍朋, 石典花, 等. 丹参药材的产地加工工艺研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(13): 1807-1811.
- [9] 张志国, 杨 磊, 张 琴, 等. 牡丹皮产地鲜切之商榷 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(4): 944-946.
- [10] 杜伟锋, 罗云云, 石森林, 等. 延胡索产地鲜切加工工艺响应面优化研究 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1111-1116.
- [11] 鲁士臻. 中药饮片浸润条件的探讨 [J]. 天津药学, 1991, 3(2): 34-36.
- [12] 庄立品, 梁志才, 李 欣. 中药材切制浸润的新方法 [J]. 中成药研究, 1983, 5(11): 14-15.
- [13] 石玉红, 李小林, 李敦兵, 等. 天麻饮片切制中“浸润”的探索 [J]. 黑龙江中医药, 2003, 32(4): 54.
- [14] 肖永庆, 原思通, 王永炎. 关于实现中药饮片生产规范化相关问题的建议 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7): 487-488.
- [15] 孙亚丽. 中药饮片全浸润生产工艺 [J]. 中国医药学报, 1997, 12(3): 57-58.
- [16] 程敬伦, 庄立品, 王 琦. 中药材减压冷浸软化装置的研制与应用 [J]. 中药通报, 1985, 10(8): 20-21.
- [17] 王 琦, 庄立品. DCS 型中药材冷浸软化装置 [J]. 中成药, 1990, 12(9): 39.